

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-20857

(24) (44) 公告日 平成7年(1995)3月8日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 9/127	D			
38/16	A B Z			
47/34	J			
		8314-4C	A 6 1 K 37/ 14	A B Z

請求項の数4(全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平1-63507

(22) 出願日 平成1年(1989)3月17日

(65) 公開番号 特開平2-149512

(43) 公開日 平成2年(1990)6月8日

(31) 優先権主張番号 特願昭63-198915

(32) 優先日 昭63(1988)8月11日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 999999999

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72) 発明者 吉岡 浩

静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内

(72) 発明者 後藤 博

静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内

(74) 代理人 弁理士 高木 千嘉 (外1名)

審査官 後藤 圭次

(56) 参考文献 特開 昭58-49393 (J P, A)

特開 昭60-58915 (J P, A)

特開 昭62-95134 (J P, A)

(54) 【発明の名称】 リボソームおよびその製法

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】薬物または生理活性物質を担持させたりボソームであって、該リボソームの表面にのみポリエチレングリコール結合リン脂質が結合し、該ポリエチレングリコール結合リン脂質のリン脂質部分がリボソーム膜を構成する脂質層に固定してなり、ポリエチレングリコール部分はリボソーム表面から外方向に伸びてなるリボソーム。

【請求項2】生理活性物質がヘモグロビンである請求項1記載のリボソーム。

【請求項3】リン脂質がホスファチジルエタノールアミンである請求項1または2記載のリボソーム。

【請求項4】薬物または生理活性物質を担持させたりボソームの懸濁液にポリエチレングリコール結合リン脂質を添加して請求項1ないし3のいずれかの項に記載のリ

ボソームを製造することを特徴とするリボソームの製法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【産業上の利用分野】

本発明はリボソーム表面への蛋白質の吸着が抑制されたあるいはリボソームの凝集が防止されたりボソームおよびその製法に関する。

## 【従来の技術】

リボソームを水溶性あるいは脂溶性の薬物の担体として利用しようとする試みが広く行われている (Gregoriadis et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 446, 319 (1985))。また、リボソームの内水相に動物の酸素運搬体であるヘモグロビンを含有させ、リボソームを人工赤血球として利用する試みも行われている (特開昭62-178521)。しかしながら、これらの試みにおいて使用されているリボソ

ームのリボソーム膜構成材料はリン脂質やコレステロールなどの天然あるいは合成の脂質からのみなるものであった。

〔発明が解決しようとする課題〕

リボソームを薬物等の運搬体として利用する場合、リボソームを生体の血管内へ投与する必要がある。しかし、従来一般に使用されている脂質のみから成るリボソームは、生体の血漿成分の蛋白質（例えばアルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン等）を吸着し、吸着された蛋白質を介してリボソーム同士が凝集するという問題があった。特にリボソームの粒径が $0.1\mu\text{m}$ を超える場合に、この問題は顕著であった。通常一般に利用されるリボソームの粒径は $0.1\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$ であって、そのままの状態であれば、毛細血管でも内径が数 $\mu\text{m}$ はあるので生体の血管内を通過するのに障害とはならない。しかしながら、リボソームが血漿成分の蛋白質を吸着することにより凝集してしまうと、その凝集物の大きさは数十 $\mu\text{m}$ にも達する。もし、血管内で凝集が生起すればリボソームの凝集物が血管を栓塞し、血流を阻害して生体を死に至らしめる危険性がある。

特にリボソームを人工赤血球として利用する場合、大量のリボソームを投与しなければならず、血漿中でのリボソームの凝集は無視できない問題であった。しかし、血漿中でのリボソームの凝集を防止する技術は従来全くなかった。

また、リボソームを生体内に投与した場合、リボソームを抗原とした抗体としての蛋白質（イムノグロブリン）がリボソームに吸着し、貪食細胞（マクロファージ）に異物認識を与え、リボソームがマクロファージに取り込まれ、リボソームが短時間のうちに消失してしまう。そこでリボソームへの蛋白質吸着を抑制することにより、血漿中のリボソームの消失時間を遅延させることができる。

また、天然の赤血球中のヘモグロビン濃度は約30%であり、全血液中の赤血球の体積割合（ヘマトクリット）が約50%であるので、全血液中のヘモグロビン濃度は約15%である。従って、天然の赤血球に比べて、粒径の小さなリボソームにヘモグロビンを内包させる人工赤血球では、ヘモグロビン濃度30%以上のヘモグロビン水溶液をリボソーム化しなければ、人工赤血球懸濁液中のヘモグロビン濃度を15%としたとき人工赤血球懸濁液中の人工赤血球の体積割合が50%を越えてしまい、流動性の乏しい懸濁液となり、これを循環血流中に投与すれば循環動態に悪影響を及ぼす。即ち、できるかぎり少量の脂質で大量のヘモグロビンをリボソームの内水相にカプセル化すること、言い替えれば、高いカプセル化効率の人工赤血球製造方法が望ましい。しかし、透析法や逆相法ではヘモグロビン濃度30%以上の高濃度、高粘度のヘモグロビン水溶液をリボソーム化することは困難である。また、薄膜法はリボソーム形成脂質を有機溶媒に均一溶解

後、有機溶媒を除去した脂質薄膜に水性溶液を加えて分散させる方法であるが、有機溶媒を除去した後のリボソーム形成脂質は固化、あるいはほとんど流動性を失った状態となるため、この状態で水性溶液を加えても容易に水和分散させることができない。水性溶液が高濃度のヘモグロビン水溶液である場合、グロビンタンパクへの結合水の割合が高く、脂質を水和させるための自由水の量が少ないので、さらに、効率の良いリボソーム化が困難であった。従って本発明の目的は、リボソーム表面への蛋白質の吸着が抑制されたあるいはリボソームの凝集が防止されたリボソームおよびその製法を提供することにある。さらに本発明の目的は、高濃度のヘモグロビンを効率良くリボソーム化する人工赤血球の製造方法を提供することにある。

〔問題点を解決するための手段〕

上記目的を達成するため、本発明者が鋭意研究を重ねた結果、リボソームの脂質層に特定の蛋白質吸着抑制剤を含有させることにより血漿中で蛋白質がリボソーム表面に吸着するのを防止することができ、ひいてはリボソーム同士の凝集を防止し、さらに高濃度のヘモグロビン水溶液を用いて人工赤血球を製造する場合でも、脂質の水和が容易となり、効率良く高濃度のヘモグロビンをリボソーム化できることを見出し、本発明を完成した。

本発明によれば下記のリボソーム表面への蛋白質の吸着が抑制されたあるいはリボソームの凝集が防止されたリボソームおよびその製法が提供される。

- 1) 薬物または生理活性物質を担持させたりリボソームであって、該リボソームの表面にのみポリエチレングリコール結合リン脂質が結合し、該ポリエチレングリコール結合リン脂質のリン脂質部分がリボソーム膜を構成する脂質層に固定してなり、ポリエチレングリコール部分はリボソーム表面から外方向に伸びてなるリボソーム。
- 2) 生理活性物質がヘモグロビンである第1項記載のリボソーム。
- 3) リン脂質がホスファチジルエタノールアミンである第1項または第2項記載のリボソーム。
- 4) 薬物または生理活性物質を担持させたりリボソームの懸濁液にポリエチレングリコール結合リン脂質を添加して第1ないし3項のいずれかの項に記載のリボソームを製造することを特徴とするリボソームの製法。

本発明におけるリボソーム表面への蛋白質吸着抑制剤またはリボソーム凝集防止剤は、一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有する化合物である。

疎水性部の好適な例としては長鎖脂肪族アルコール、ステロール、ポリオキシプロピレンアルキルまたはグリセリン脂肪酸エステルアルコール性残基、およびリン脂質があげられる。親水性高分子鎖部の好適な例としては、ポリエチレングリコールがあげられる。

本発明においては特に、ポリエチレングリコール（以下PEGという）と上記疎水性部アルコール性残基とがエー

テル結合したPEG付加型非イオン界面活性剤、およびPEGとリン脂質とが共有結合したPEG結合リン脂質が好ましい。

本発明におけるポリエチレングリコール結合リン脂質とは、リン脂質の親水部（極性頭部）にポリエチレングリコール（PEG）を共有結合した構造の分子であり、一分子中に1または複数のPEG鎖を含有する。PEG鎖のリン脂質と結合していない側の末端は、水酸基あるいはメチル、エチル等の短鎖のエーテル、酢酸、乳酸等の短鎖のエステルであっても良い。

本発明の目的のためには、PEG結合リン脂質分子中のPEG鎖長は、平均重合度で5～1000モルの範囲が望ましく、より好ましくは40～200モルである。この範囲を下回る場合には血漿中でのリボソーム凝集防止効果が発現され離く、この範囲を上回る場合にはPEG結合リン脂質の水溶性が高くなり、リボソーム膜中に固定され難くなる。PEGとリン脂質を共有結合するには、リン脂質の極性部に反応活性な官能基が必要である。これには、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基、ホスファチジルグリセロールの水酸基、ホスファチジルセリンのカルボキシル基等があり、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基が好ましく利用される。

リン脂質の反応活性な官能基とPEGを共有結合させるには、塩化シアヌルを用いる方法、カルボジイミドを用いる方法、酸無水物を用いる方法、グルタルアミドヒドを用いる方法、等がある。ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基とPEGを結合するには、塩化シアヌル（2,4,6-トリクロロ-s-トリアジン）を用いる方法が好ましく利用される。例えば、モノメトキシポリエチレングリコールと塩化シアヌルを公知の反応操作で結合することにより、2-O-メトキシポリエチレングリコール-4,6-ジクロロ-s-トリアジン（活性化PEG1）または2,4-ビス（O-メトキシポリエチレングリコール）-6-クロロ-s-トリアジン（活性化PEG2）が得られる（Y. Inada, et al., Chem. Lett., 7, 773-776 (1980)）。これらとアミノ基を脱塩酸縮合反応により結合させることで、ホスファチジルエタノールアミンの極性頭部にPEGを共有結合させたリン脂質が得られる。ここで、活性化PEG1を用いた場合は一分子のリン脂質中に1本のPEG鎖を、活性化PEG2を用いた場合は2本のPEG鎖を含有することになる。また、モノメトキシPEGと無水コハク酸を反応させてPEG末端にカルボキシル基を導入し、これとホスファチジルエタノールアミンをカルボジイミド存在下で反応させることにより、アミド結合を介したPEG結合リン脂質が得られる。

本発明のPEG結合リン脂質を脂質層に含有するリボソームを製造するには、PEG結合リン脂質をリボソーム形成脂質と予め均一に混合して、得られた混合脂質を用いて常法によりリボソームを形成させれば良い。ここで言うリボソーム形成脂質とは、ホスファチジルコリン、スフ

ィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン等に代表されるリン脂質で卵黄、大豆その他の天然材料に由来するもの、または、有機化学的な合成手段により得られるものを単独でまたは混合して主成分とする。さらに膜安定化剤としてコレステロール、コレスタノール等のステロール類や、荷電物質としてホスファチジル酸、ジセチルホスフェート、高級脂肪酸等を添加しても良い。リボソーム形成脂質とPEG結合リン脂質の混合比は、主成分であるリン脂質に対して、モル比で0.1モル%～50モル%、好ましくは0.5モル%～20モル%、より好ましくは1モル%～5モル%である。この範囲を下回る場合には、血漿中でのリボソーム凝集防止効果が不十分となり、この範囲を上回る場合には、PEG結合リン脂質の可溶性により、リボソームが不安定となる。

PEG結合リン脂質と予め均一に混合するには、例えば、両者を揮発性の有機溶媒に溶解させた後、エバポレーションにより、有機溶媒を除去すれば良い。もし、脂溶性の薬物等をリボソームに含有させるのであれば、このとき、リボソーム形成脂質と共に混合しておけば良い。得られた混合脂質からリボソームを形成させるには、通常一般に行われているリボソーム化の方法に従って行うことが可能であり、例えば、振とう法、超音波照射法、フレンチプレス法等いずれの方法を用いても良い。上記のPEG結合リン脂質を上記の範囲で使用するかぎりにおいては、粒径0.1 $\mu$ m～1 $\mu$ mのリボソームが得られ、内水相に十分な水溶性の薬物や生理活性物質等を担持させることができる。得られたリボソームの脂質層中にはPEG結合リン脂質が含有されているが、その含有率は必ずしも初めの脂質との混合割合と同一ではない。PEG結合リン脂質の水溶性が高い場合にはリボソーム化の過程で、その一部が膜外の水相中に溶出している場合もあろう。リボソーム脂質膜中におけるPEG結合リン脂質の存在状態は明らかではないが、PEG結合リン脂質の疎水性部がリボソーム膜中の疎水性領域内にあって、親水性のPEG鎖が膜中の親水性領域から膜外の水相媒体中にかけて存在しているものと推定される。従って、本方法によって得られたリボソームにおいては、PEG結合リン脂質のPEG鎖がリボソームの外水相側及び内水相側の両側に存在することになる。

本発明のPEG結合リン脂質は、必ずしも水に透明に溶解する必要はない。しかし、本発明のPEG結合リン脂質が水に対し、均一に溶解する場合は、さらに別の方法によっても本発明のリボソームを製造することができる。すなわち、通常一般に行われているリボソーム化の方法に従って製造された、すでに水溶性あるいは脂溶性の薬物等を担持しているリボソームの懸濁液に、本発明のPEG結合リン脂質をそのままあるいは水溶液として添加することによっても、本発明のPEG結合リン脂質を脂質層中に含有するリボソームを製造することができる。この場

合、PEG結合リン脂質は水溶性中でミセル様の分子集合体を形成して分散していると思われるが、ここにリボソームが共存すれば、PEG結合リン脂質分子中の疎水性部が、リボソーム膜中の疎水性領域に疎水性相互作用によって固定され、親水性のPEG鎖はリボソームの外水相側表面にのみ露出した構造となる。

PEG結合リン脂質を水溶液として添加する場合、その濃度は、臨界ミセル濃度以上であれば良いが、その濃度が低いと、リボソームへの吸着量が不十分となり血漿中でのリボソーム凝集防止効果が低下し、その濃度が高すぎるとリボソームを不安定にし、内水相に担持された水溶性薬物等の漏れ出しを引き起こしてしまう。従って、その濃度はリボソーム懸濁液中の濃度で0.01%~20%、より好ましくは、0.05%~2%である。

本発明のPEG結合リン脂質を脂質層に含有するリボソームは、また別の方法によっても製造することができる。すなわち反応活性な官能基を持つリン脂質を含有するリボソームを常法にて製造した後、リボソーム外液に片末端活性化PEGを添加してリン脂質と結合させる。例えば、ホスファチジルエタノールアミンを全リン脂質中1モル%~50モル%含有するリボソームを製造し、塩基性(pH9以上)緩衝液中、活性化PEG2を1%~20%の濃度で添加し、室温で1時間~24時間反応させる。この場合、親水性のPEG鎖はリボソームの外水相側表面にのみ露出した構造となる。

本発明におけるポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤とは、親水性部としてポリオキシエチレン鎖を有し、親油性部(疎水性部)のアルコール性残基と、このポリオキシエチレン鎖とがエーテル結合により結ばれた分子構造を持つ非イオン界面活性剤である。例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンステロールエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、等である。

ポリオキシエチレン付加型非イオン界面活性剤でも、ポリオキシエチレン鎖と親油性部がエステル結合により結ばれた分子構造を持つポリオキシエチレンエステル付加型非イオン界面活性剤をリボソームの脂質層に含有させた場合には、血漿中での蛋白質吸着抑制およびリボソーム凝集防止効果は低い。

本発明の目的のためにはポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤分子中のポリオキシエチレン鎖長は、エチレンオキサイド平均重合度で5~1000モルの範囲が望ましく、より好ましくは10~40モルである。この範囲を下回る場合には血漿中でのリボソーム凝集防止効果が発現され難く、この範囲を上回る場合には非イオン界面活性剤の水溶性が高くなり、リボソーム膜中に固

定され難くなる。

種々のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤の中でも、特にポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンステロールエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルをリボソームの脂質層に含有させた場合に、リボソームの血漿中での蛋白質吸着抑制および凝集防止効果が高い。

ポリオキシエチレンアルキルエーテルは、ポリオキシエチレンと飽和または不飽和の高級脂肪族アルコールがエーテル結合により結ばれた構造を持つ。脂肪族アルコールの炭素数は8~22の範囲が好適に用いられる。

ポリオキシエチレンステロールエーテルとは、ポリオキシエチレンとステロールがエーテル結合により結ばれた分子構造を持つものを言う。ステロールにはコレステロール、コlestanolなどの動物ステロール(ズーステロール)、シトステロール、スチグマステロールなどの植物ステロール(フィトステロール)、エルゴステロール、チモステロールなどの菌類ステロール(マイコステロール)などがあり、本発明のポリオキシエチレンステロールエーテル中のステロールの種類は特に限定する必要はないが、コレステロールと同様の側鎖構造を持つものが好適に用いられる。

ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテルとは、飽和または不飽和の高級脂肪族アルコールにポリオキシプロピレンがエーテル結合により付加し、さらにそのポリオキシプロピレンの末端水酸基にポリオキシエチレンがエーテル結合により付加した分子構造を持つ。ポリオキシプロピレンの平均重合度は2~8が好ましく、脂肪族アルコールの炭素数は8~22の範囲が好適に用いられる。

ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルとは、グリセリン脂肪酸エステル(モノグリセリドまたはジグリセリド)の遊離の水酸基にポリオキシエチレンがエーテル結合により付加した分子構造を持つ。脂肪酸は飽和、不飽和のいずれであっても良いが、その炭素数は8~22の範囲が好適に用いられる。

本発明のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤を脂質層に含有するリボソームを製造するには、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤をリボソーム形成脂質と予め均一に混合して、得られた混合脂質を用いて常法によりリボソームを形成させれば良い。ここで言うリボソーム形成脂質とは、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン等に代表されるリン脂質で卵黄、大豆その他の天然材料に由来するもの、または、有機化学的な合成手段により得られるものを単独でまたは混合して主成分とする。さらに膜安定剤としてコレステロール、コレスタノール等のステロール類や、荷電物質としてホスファチジン酸、ジセチルホス

フェート、高級脂肪酸等を添加しても良い。リボソーム形成脂質とポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤の混合比は、主成分であるリン脂質1モルに対して、エチレンオキサイド単位で0.5モル～20モル、より好ましくは1モル～5モルである。これは、例えば、リン脂質としてジバルミトイルホスファチジルコリン（分子量752）、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤としてエチレンオキサイドの平均重合度25のポリオキシエチレンフィトスタノールエーテル（分子量約1500）を用いる場合、リン脂質1モルに対するポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤分子では0.02～0.8モル、より好ましくは0.04～0.2モルであり、重量比ではリン脂質1重量部に対し、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤0.04～1.6重量部、より好ましくは0.08～0.4重量部である。この範囲を下回る場合には、血漿中でのリボソーム凝集防止効果が不十分となり、この範囲を上回る場合には、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤の可溶化能により、リボソームが不安定となる。ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤をリボソーム形成脂質と予め均一に混合するには、例えば、両者を揮発性の有機溶媒に溶解させた後、エバポレーションにより、有機溶媒を除去すれば良い。もし、脂溶性の薬物等をリボソームに含有させるのであれば、このとき、リボソーム形成脂質と共に混合しておけば良い。得られた混合脂質からリボソームを形成させるには、通常一般に行われているリボソーム化の方法に従って行うことが可能であり、例えば、振とう法、超音波照射法、フレンチプレス法等いずれの方法を用いても良い。上記のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤を上記の範囲で使用するかぎりにおいては、粒径 $0.1\mu\text{m}$ ～ $1\mu\text{m}$ のリボソームが得られ、内水相に十分な水溶性の薬物や生理活性物質等を担持させることができる。得られたリボソームの脂質層中にはポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤が含有されているが、その含有率は必ずしも初めの脂質との混合割合と同一ではない。ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤の水溶性が高い場合にはリボソーム化の過程で、その一部が膜外の水相中に溶出している場合もありうる。リボソーム脂質膜におけるポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤の存在状態は明らかではないが、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤分子中の疎水性部がリボソーム膜中の疎水性領域内にあって、親水性のポリオキシエチレン鎖が膜中の親水性領域から膜外の水性媒体中にかけて存在しているものと推定される。従って、本方法によって得られたリボソームにおいては、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤のポリオキシエチレン鎖がリボソームの外水相側及び内水相側の両側に存在することになる。

本発明のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤は、必ずしも水に透明に溶解する必要はない。しかし、本発明のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤が水に対し、均一に溶解する場合は、さらに別の方法によっても本発明のリボソームを製造することができる。すなわち、通常一般に行われているリボソーム化の方法に従って製造された、すでに水溶性あるいは脂溶性の薬物等を担持しているリボソームの懸濁液に、本発明のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤をそのまま、あるいは水溶液として添加することによっても、本発明のポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤を脂質層中に含有するリボソームを製造することができる。この場合、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤は水溶液中でミセルを形成して分散しているが、ここにリボソームが共存すれば、ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤分子中の疎水性部が、リボソーム膜中の疎水性領域に疎水的相互作用によって固定され、親水性のポリオキシエチレン鎖はリボソームの外水相側表面にのみ露出した構造となる。

ポリオキシエチレンエーテル付加型非イオン界面活性剤を水溶液として添加する場合、その濃度は、臨界ミセル濃度以上であれば良いが、その濃度が低いと、リボソームへの吸着量が不十分となり血漿中でのリボソーム凝集防止効果が低下し、その濃度が高すぎるとリボソームを不安定にし、内水相に担持された水溶性薬物等の漏れ出しを引き起こしてしまう。従って、その濃度はリボソーム懸濁液中の濃度で0.01%～5%、より好ましくは0.1%～2%である。

人工赤血球を製造する場合、非イオン界面活性剤とリボソーム形成脂質との混合割合は0.5～30重量%が好ましく、この範囲を下回る場合には効率の良いヘモグロビンのリボソーム化が達成され難く、この範囲を上回る場合には、非イオン界面活性剤の可溶化能により、生成する人工赤血球が不安定となる。

本発明で使用するリボソーム形成脂質は、ホスファチジルコリン（レシチン）、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン等に代表されるリン脂質で卵黄、大豆その他の天然材料に由来するもの、または、有機化学的な合成手段により得られるものを単独でまたは混合して主成分とする。さらに膜安定化剤としてコレステロール、コレスタノール等のステロール類や、荷電物質としてホスファチジン酸、ジセチルホスフェート、高級脂肪酸等を添加しても良い。

特に、これらリン脂質が不飽和結合を有する場合、これが過酸化反応を受けることによって発生する脂質過酸化物による毒性の問題、また内包ヘモグロビンが酸化変性を受け易いといった問題があるため、この不飽和基に水素添加したものが好適に用いられる。例えば、入手が容易な水素添加天然リン脂質として水素添加卵黄レシチ

ン、水素添加大豆レシチンなどがある。これら水素添加天然リン脂質を主成分とする場合、その相転移温度は50℃程度と高温である。一般にリボソームは相転移温度以上で操作しなければ形成され難いが、ヘモグロビンをリボソーム化する場合、40℃以上で操作するとヘモグロビンが熱変性を受けてしまう。しかし、リボソーム形成脂質としてステロール類を含有させれば、脂質混合物全体として明確な相転移点が存在しなくなり、操作温度が主成分リン脂質の相転移温度以下でも十分に人工赤血球を製造することができる。また、生成した人工赤血球同士が凝集することを防止するために通常、荷電物質を含有させるが、これには高級飽和脂肪酸が好ましく用いられる。これらリボソーム形成脂質の混合比率はリン脂質1重量部に対してステロール類0.2~1重量部、高級飽和脂肪酸0.05~0.2重量部が適当である。

非イオン界面活性剤とリボソーム形成脂質を混合するには、例えばクロロホルム、ジクロロメタン等の非イオン界面活性剤とリボソーム形成脂質を均一に溶解しうる揮発性有機溶媒に、これらを均一溶解後、有機溶媒をエバポレーション、凍結乾燥、スプレードライ等の方法により除去すれば良い。

得られた混合脂質から人工赤血球を形成させるには、ヘモグロビン水溶液中に該混合脂質を水和分散させればよい。水和分散の方法は単に両者を機械的に混合するだけでも良いが、さらに、フレンチプレス細胞破砕機等を用いての高圧吐出処理を行うことが望ましい。ヘモグロビン水溶液のヘモグロビン濃度は30~60%が好ましく、この範囲を下回る場合には、ヘモグロビンのカプセル化効率が低く、この範囲を上回る場合には、ヘモグロビン水溶液の粘度が著しく高くなり、非イオン界面活性剤を加えた場合でも、水和分散が困難になる。

特に、水素添加リン脂質、ステロール類、高級飽和脂肪酸を上記範囲で混合したリボソーム形成脂質と上記範囲のヘモグロビン水溶液を使用する本発明の人工赤血球の製造方法においては、ヘモグロビンカプセル化効率の著しく低い粒径0.01 $\mu$ m~0.03 $\mu$ mの人工赤血球は殆ど生成せず、大部分が粒径0.1 $\mu$ m以上のヘモグロビンカプセル化効率の高い人工赤血球となる。

得られた人工赤血球の脂質層中には非イオン界面活性剤が含有されているが、その含有率は必ずしも初めの脂質との混合割合と同一ではない。非イオン界面活性剤の水溶性が高い場合にはリボソーム化の過程で、その一部が膜外の水相中に溶出している場合もありうる。

次に参考例、実施例および比較例を示して本発明をさらに具体的に説明する。

#### 参考例 1

水素添加卵黄レシチン630mg、コレステロール317mg、ミリスチン酸53mg、ポリオキシエチレンフィトスタノールエーテル（エチレンオキサイド平均重合度25、日光ケミカルズ（株）社製BPSH25）150mgをジクロロメタン20ml

に溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に50%ヘモグロビン水溶液20mlを加え、振とう混合後、250kg/cm<sup>2</sup>の圧力でフレンチプレス処理を10回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理（17,000r.p.m.30分）し、沈澱リボソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られたリボソームの平均粒径は0.2 $\mu$ mであった。このリボソーム懸濁液0.1mlとクエン酸加ヒト血漿0.5mlを混合し、光学顕微鏡（400倍）により観察したところ、1 $\mu$ mを越えるリボソーム凝集物はほとんど認められなかった。

#### 参考例 2

水素添加卵黄レシチン630mg、コレステロール317mg、ミリスチン酸53mgをジクロロメタン20mlに溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に50%ヘモグロビン水溶液20mlを加え、振とう混合後、500kg/cm<sup>2</sup>の圧力でフレンチプレス処理を10回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理（17,000r.p.m.30分）し、沈澱リボソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られたリボソームの平均粒径は0.2 $\mu$ mであった。このリボソーム懸濁液0.1mlとクエン酸加ヒト血漿0.5mlを混合し、光学顕微鏡（400倍）により観察したところ、リボソームは完全に凝集し、その凝集物の大きさは50 $\mu$ mを越えるものであった。

ヘモグロビン濃度で5%に調整した上記のリボソーム懸濁液1mlに、2%のポリオキシエチレンオレイルエーテル（エチレンオキサイド平均重合度20）を含む生理食塩水9mlを加え、室温で30分間放置した後、生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理（17,000r.p.m.30分）し、沈澱リボソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。このリボソーム懸濁液0.1mlとクエン酸加ヒト血漿0.5mlを混合し、光学顕微鏡（400倍）により観察したところ、1 $\mu$ mを越えるリボソーム凝集物はほとんど認められなかった。

#### 参考例 3

参考例1のポリオキシエチレンフィトスタノールのかわりに、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル（エチレンオキサイド平均重合度20、プロピレンオキサイド平均重合度8）150mgを用いる以外は、参考例1と全く同様の検討を行ったところ、参考例1と同様の結果を得た。

#### 参考例 4

参考例1のポリオキシエチレンフィトスタノールのかわ



りに、ポリオキシエチレングリセリルジステアレート（エチレンオキサイド平均重合度30）150mgを用いる以外は、参考例1と全く同様の検討を行ったところ、参考例1と同様の結果を得た。

#### 比較例 1

参考例1のポリオキシエチレンフィトスタノールエーテルのかわりに、エチレンオキサイド平均重合度25のポリオキシエチレンモノステアレート150mgを用いる以外は参考例1と全く同様の検討を行ったところ、リボソームは完全に凝集し、その凝集物の大きさは50 $\mu$ mを越えるものであった。尚、ポリオキシエチレングリセリルジステアレート（ $n=100$  or  $140$ ）についても同様の結果であった。

#### 比較例 2

参考例2のポリオキシエチレンオレイルエーテルにかえて、ポリオキシエチレンモノステアレートを用いたところ、リボソームは完全に凝集し、その凝集物の大きさは50 $\mu$ mを越えるものであった。

#### 参考例 5

水素添加卵黄レシチン1.81g、コレステロール0.913g、ミリスチン酸0.153g、非イオン界面活性剤であるポリオキシエチレンフィトスタノール（エチレンオキサイド平均重合度25、日光ケミカルズ（株）社製BPSH25）0.142gをジクロロメタン20mlに溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に50%ヘモグロビン水溶液20mlを加え、振とう混合後、250kg/cm<sup>2</sup>の圧力でフレンチプレス処理を10回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により10倍に希釈して、孔径0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過した後、遠心分離処理（17,000r.p.m. 30分）し、沈澱リボソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。ヘモグロビンカプセル化効率の低い人工赤血球は比重が小さいため、このとき沈澱せず除去される。洗浄後の沈澱人工赤血球をヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られた人工赤血球の平均粒径は0.2 $\mu$ mであった。この人工赤血球懸濁液中の全脂質濃度は33mg/ml、ヘモグロビン回収率は12%であった。

非イオン界面活性剤を加えずに、全く同様の操作を行ったところ、平均粒径0.2 $\mu$ mの人工赤血球が得られ、ヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた人工赤血球懸濁液中の全脂質濃度は39mg/ml、ヘモグロビン回収率は7%であった。

#### 参考例 6

ジバルミトイルホスファチジルエタノールアミン150mg、活性PEG2（PEG平均分子量5,000 $\times$ 2、生化学工業（株）製）2.5gを脱水クロロホルム50mlに溶解、炭酸ナトリウム2gを加えて、室温終夜反応させた。ニンヒドリン呈色の消失により反応終了を確認後、反応液を濾過し、ヘキサンを加えて再沈精製、真空乾燥してPEG結合リン脂質を得た。

水素添加卵黄レシチン630mg、コレステロール317mg、ミリスチン酸53mg、上記のPEG結合リン脂質150mgをジクロロメタン20mlに溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に50%ヘモグロビン水溶液20mlを加え、振とう混合後、250kg/cm<sup>2</sup>の圧力でフレンチプレス処理を10回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理（17,000r.p.m. 30分）し、沈澱リボソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られたリボソームの平均粒径は0.2 $\mu$ mであった。このリボソーム懸濁液0.1mlとクエン酸加ヒト血漿0.5mlを混合し、光学顕微鏡（400倍）により観察したところ、1 $\mu$ mを越えるリボソーム凝集物はほとんど認められなかった。

#### 実施例 1

水素添加卵黄レシチン630mg、コレステロール317mg、ミリスチン酸53mgをジクロロメタン20mlに溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に50%ヘモグロビン水溶液20mlを加え、振とう混合後、500kg/cm<sup>2</sup>の圧力でフレンチプレス処理を10回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理（17,000r.p.m. 30分）し、沈澱リボソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。得られたリボソームの平均粒径は0.2 $\mu$ mであった。このリボソーム懸濁液0.1mlとクエン酸加ヒト血漿0.5mlを混合し、光学顕微鏡（400倍）により観察したところ、リボソームは完全に凝集し、その凝集物の大きさは50 $\mu$ mを越えるものであった。

ヘモグロビン濃度で5%に調整した上記のリボソーム懸濁液1mlに、1%の参考例6で得られたPEG結合リン脂質を含む生理食塩水9mlを加え、室温で30分間放置した後、生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理（17,000r.p.m. 30分）し、沈澱リボソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。このリボソーム懸濁液0.1mlとクエン酸加ヒト血漿0.5mlを混合し、光学顕微鏡（400倍）により観察したところ、1 $\mu$ mを越えるリボソーム凝集物はほとんど認められなかった。

#### 参考例 7

ホスファチジルエタノールアミンを30モル%含有する水素添加大豆レシチンを水素添加卵黄レシチンのかわりに用いる以外は実施例1と同様にして、ヘモグロビン含有リボソームを得た。0.1Mほう酸緩衝液（pH10）中ヘモグロビン濃度で5%に調整した上記のリボソーム懸濁液1mlに、活性化PEG2を100mg添加し、室温終夜反応させた。生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離処理（17,000

r. p. m. 30分) し、沈澱リボソームを生理食塩水140mlにより、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈澱リボソームをヘモグロビン濃度で5%となるように生理食塩水中に懸濁させた。このリボソーム懸濁液0.1mlとクエン酸加ヒト血漿0.5mlを混合し、光学顕微鏡(400倍)により観察したところ、1 $\mu$ mを越えるリボソーム凝集物はほとんど認められなかった。

#### 実施例 2

モノメトキシPEG5000(ユニオンカーバイド社製)50gを1,2-ジクロロメタン250mlに溶解、無水コハク酸5gとピリジン4mlを加えて、3日間沸点還流した。濾過、エバポレーション後、100mlの蒸留水に溶解し、水相をエーテルで洗浄後クロロホルム100mlに抽出した。エバポレーション後、酢酸エチルで再結晶して片末端カルボキシPEGを得た。これを725mgとジバルミトイルホスファチジルエタノールアミン100mg、さらにジシクロヘキシルカルボジイミド30mgを30mlのクロロホルムに溶解、50℃で終夜反応させた。反応液をヘキサン300mlに再沈してアミド結合を介するPEG結合リン脂質を得た。これを用いた参考例6および実施例1と同様の実験で同様の結果を得た。

#### (発明の効果)

以上詳しく説明したように、本発明によればリボソームの脂質層に特定の蛋白質吸着抑制剤を含有させることによって、血漿中でのリボソームへの蛋白質の吸着を抑制し、リボソームの凝集を防止したリボソームを提供することができる。

蛋白質吸着抑制剤は疎水性部と親水性高分子鎖部からなり、親水部がリボソームの表面に露出していることによって、血漿タンパクのリボソームへの吸着が抑制され、

その結果、血漿中でのリボソームの凝集が防止される。従って、生体の血管内へリボソームを投与した場合でも、リボソームの凝集物が血管内で栓塞して血流を阻害する心配がなく、特に大量のリボソームを投与する必要がある人工赤血球として有用性が高い。

本発明のリボソームの製造方法は、常法により製造されたリボソームの懸濁液に蛋白質吸着抑制剤を添加する方法であるので、従来知られているリボソームの応用技術のいずれの例にも広く適用することができる。

さらに本発明のリボソーム蛋白質吸着抑制剤を使用することにより、リボソーム形成脂質の水和分散が促進され、高濃度のヘモグロビン水溶液を用いた場合でも、ヘモグロビンカプセル化効率の高い人工赤血球を高い収率で得ることができる。

特に、水素添加リン脂質、ステロール類、高級飽和脂肪酸を混合したリボソーム形成脂質と高濃度のヘモグロビン水溶液を使用する本発明の人工赤血球の製造方法においては、ヘモグロビンカプセル化効率の著しく低い粒径0.01 $\mu$ m~0.03 $\mu$ mの人工赤血球は殆ど生成せず、大部分が粒径0.1 $\mu$ m以上のヘモグロビンカプセル化効率の高い人工赤血球となる。

本発明の製造方法で得られるヘモグロビンカプセル化効率の高い人工赤血球では、人工赤血球懸濁液中のヘモグロビン濃度を高くしても、全脂質濃度は低く抑えることができるので、循環血流中へ投与した時の循環動態に与える悪影響も少なく、また脂質に由来する毒性も低く抑えることができる。しかも、従来の脂質分散のための手法はそのまま適用できるので、工業的な人工赤血球の製造方法として広範に応用し得る極めて優れた方法である。